

EUROPEAN PATENT APPLICATION 0 448 093 A2

Translated From The German by Ruth Boggs (703.378.9305. REZB@aol.com)



SECRETION OF HIRUDIN DERIVATIVES

A process to obtain hirudin derivatives from E. coli-secretor mutants, where

- (1) a recombinant vector is constructed where the gene that codes for a hirudin derivative is located directly behind a DNA-segment that codes for a bacterial signal peptide,
- (2) the recombinant vector constructed in Step 1 is used to transform an E. coli-secretor mutant,
- (3) the transformed cells are cultivated in a medium, and
- (4) the hirudin derivative is obtained from the medium,

as well as a recombinant vector that contains one or more copies of a gene construct that codes for a protein consisting of a bacterial signal peptide and a hirudin derivative, and a hirudin derivative with the N-terminal amino acid sequence A - Thr-Tyr-Thr-Asp, wherein A means Ala, Gin, His, Phe, Tyr, Glu, Ser, Asp or Asn.



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Suchanfrage in der Europäischen Datenbank
EP 96 30 934 A. 3
Publ. Nr. 408 RT - EP



Veröffentlichungsnummer: **0 448 093 A2**

(2)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(31) Anmeldenummer: 91104422.0

(51) Int. Cl.⁵: C12N 15/15, C12P 21/02

(22) Anmeldetag: 21.03.91

(30) Priorität: 22.03.90 DE 4009268

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
25.09.91 Patentblatt 91/39

(54) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: Consortium für elektrochemische
Industrie GmbH
Zielstattstrasse 20
W-8000 München 70(DE)

(72) Erfinder: Schmid, Gerhard, Dr.
Dorfstrasse 9a
W-8000 München 60(DE)
Erfinder: Habermann, Paul, Dr.
Rossertstrasse 35
W-6239 Eppstein (Taunus)(DE)

(54) Sekretion von Hirudinderivaten.

(57) Ein Verfahren zur Gewinnung von Hirudinderiva-
ten aus E. coli-Sekretormutanten, bei dem man

(1) einen rekombinanten Vektor konstruiert, auf
dem sich das für ein Hirudinderivat kodierende
Gen direkt hinter einem DNA-Abschnitt befindet,
der für ein bakterielles Signalpeptid kodiert,

(2) mit dem in Schritt (1) konstruierten rekombin-
anten Vektor eine E. coli-Sekretormutante trans-
formiert,

(3) die transformierten Zellen in einem Medium
kultiviert und

(4) das Hirudinderivat aus dem Medium gewinnt,

sowie ein rekombinanter Vektor, der eine oder meh-
rere Kopien eines Genkonstruktes enthält, das für
ein Protein, bestehend aus einem bakteriellen Si-
gnalpeptid und einem Hirudinderivat, kodiert und ein
Hirudinderivat mit der N-terminalen Aminosäurese-
quenz A-Thr-Tyr-Thr-Asp, worin A für Ala, Gln, His,
Phe, Tyr, Glu, Ser, Asp oder Asn steht.

EP 0 448 093 A2

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Hirudinderivaten aus *E. coli*-Sekretormutanten, sowie ein Hirudinderivat mit der N-terminalen Aminosäuresequenz Ala-Thr-Tyr-Thr-Asp.

Hirudin ist ein Polypeptid mit 65 Aminosäuren und wurde ursprünglich aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* isoliert. Es wirkt als hochspezifischer Inhibitor für Thrombin, indem es mit Thrombin stabile Komplexe bildet und besitzt daher viele therapeutische Anwendungsmöglichkeiten, insbesondere zur Antikoagulations-Therapie (F. Markquardt, *Bio-med. Biochim. Acta* 44 (1985), 1007-1013).

Nach Veröffentlichung der vollständigen Aminosäuresequenz von Hirudin (J. Dodt et al., *FEBS LETTERS* 165 (2), (1984), 180-184) war die Voraussetzung für die Herstellung von Hirudin durch rekombinante DNA-Techniken und Expression in Mikroorganismen gegeben.

Die EP-A-0 158 564 (Transgene) offenbart Klonierungsvektoren zur Expression von Hirudin oder Hirudin-Analoga in einer Wirtszelle, insbesondere einer bakteriellen Zelle. Das für Hirudin kodierende Gen wird dabei durch cDNA-Synthese, ausgehend von mRNA aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* gewonnen. Insbesondere wird ein Hirudin-Derivat mit der N-terminalen Sequenz Ile-Thr-Tyr-Thr-Asp beschrieben, sowie Verfahren zu seiner Gewinnung.

In der EP-A-0 168 342 (Ciba Geigy) werden DNA-Sequenzen offenbart, welche für die natürliche Aminosäuresequenz von Hirudin kodieren, wobei die N-terminale Aminosäuresequenz Val-Val-Tyr-Thr-Asp ist. Die Expression von Hirudin erfolgt in den Mikroorganismen *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* intrazellulär.

Die EP-A-0 171 024 (Hoechst AG) offenbart ein Verfahren zur gentechnologischen Herstellung von Polypeptiden mit Hirudin-Aktivität, insbesondere in *E. coli*-Zellen, wobei die Zellen aufgeschlossen werden und aus dem Zellextrakt das Polypeptid mit Hirudin-Aktivität gewonnen wird. Ein gegebenenfalls vorhandener Fusionsprotein-Anteil kann durch proteolytische oder chemische Spaltung abgetrennt werden und das freigesetzte Hirudinmolekül aufgereinigt werden.

Der Gegenstand der DE-OS 34 45 571 (GEN-BIO-TEC) ist eine DNA-Sequenz, die für ein Protein mit der biologischen Aktivität von Hirudin kodiert, sowie ein Verfahren zur Gewinnung solcher Proteine aus *E. coli*-Zellen, die mit einem geeigneten rekombinanten Vektor transformiert sind, durch Lysis der Zellen.

Auch die Arbeit von Bergmann et al. (*Biol. Chem. Hoppe Seyler* 367 (1986), 731-740) beschreibt die Hirudin-Synthese in *E. coli*. Die Freisetzung des Hirudins aus den Zellen erfolgt durch Behandlung mit Toluol, wobei nur geringe Ausbeuten von etwa 500 ng/l A₅₇₈ Einheiten von Zellen

erzielt werden.

Die EP-A-0 200 655 (Transgene), EP-A-0 252 854 (Transgene) und EP-A-0 225 633 (Ciba Geigy) offenbaren die Gewinnung durch Sekretion von Proteinen mit Hirudin-Aktivität aus einem eukaryontischen Wirtsorganismus, insbesondere Hefe, wobei die Expression auf einem Vektor erfolgt, der eine DNA-Sequenz enthält, die ein Signalpeptid stromaufwärts des Strukturgens enthält. Es wird die Sekretion von Hirudin-Derivaten mit der N-terminalen Sequenz Val-Val-Tyr-Thr-Asp, sowie der N-terminalen Sequenz Ile-Thr-Tyr-Thr-Asp in Hefe offenbart. Dabei werden Ausbeuten bis zu 100 mg/l angegeben.

In der DE-OS 39 00 626 (Hoechst AG) wird ein Hirudin-Derivat mit der N-terminalen Sequenz Leu-Thr-Tyr-Thr-Asp offenbart. Die Expression findet vorzugsweise in Hefe statt, wobei Promotor und Signalsequenz des Hefe-Pheromon-Gens MF α zur Expression und Sekretion des Hirudin-Derivats verwendet werden.

Alle die oben beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Hirudin-Derivaten weisen jedoch Nachteile auf. So werden bei Verwendung von Hefe als Wirtsorganismus und Sekretion des Hirudins in das Kulturmedium relativ hohe Ausbeuten erhalten, jedoch ist die Kultivierung von Hefezellen langwieriger und anspruchsvoller als die von Bakterien, z.B. *E. coli*. In *E. coli*-Zellen hingegen ist jedoch die Ausbeute relativ gering oder/und bei einem Aufschluß der Zellen sind komplizierte Isolations-Verfahren notwendig.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es demgemäß, ein einfaches Verfahren zur Gewinnung von Hirudin-Derivaten zu entwickeln, bei dem Hirudin-Derivate mit hoher Ausbeute aus Bakterienzellen gewonnen werden können, ohne daß dabei ein Aufschluß der Zellen erforderlich ist.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Gewinnung von Hirudin-Derivaten aus *E. coli*-Sekretormutanten, bei dem man

- (1) einen rekombinanten Vektor konstruiert, auf dem sich das, für ein Hirudin-Derivat kodierende Gen hinter einem DNA-Abschnitt befindet, der für ein bakterielles Signalpeptid kodiert,
- (2) mit dem in Schritt (1) konstruierten rekombinanten Vektor eine *E. coli*-Sekretormutante transformiert,
- (3) die transformierten Zellen in einem Medium kultiviert und
- (4) das Hirudin-Derivat aus dem Medium gewinnt.

Unter dem Begriff Hirudin-Derivat gemäß vorliegender Erfindung sind von Hirudin abgeleitete Proteine zu verstehen, die als Thrombin-Inhibitoren wirken und eine spezifische Aktivität von mindestens 10.000 AT-U/mg (Antithrombin-Units) besitzen (Dodt et al., *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 366

(1985), 379-385). Der Begriff Hirudin-Derivat beinhaltet auch Fusionsproteine mit einem bis zu etwa 50 Aminosäuren langen N-terminalen Fusionsanteil, der teilweise oder vollständig durch proteolytische oder chemische Spaltung entfernt werden kann, wobei als Spaltprodukt ein Hirudin-Derivat mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 10.000 AT-U/mg entsteht.

Vorzugsweise werden durch das erfindungsgemäße Verfahren Hirudin-Derivate mit folgender N-terminaler Aminosäuresequenz gewonnen:

(X)_m - Z - Thr - Tyr - Thr - Asp

worin m = 0 bis 50,

X für gleiche oder verschiedene genetisch codierbare Aminosäuren steht,

Z für eine genetisch codierbare Aminosäure aus der Gruppe Leu, Ile, Ala, Val, Gly, Ser, Asp, Glu, Asn, Gln, His, Met, Phe und Tyr steht.

Sofern m größer als 0 ist, enthält vorzugsweise die Sequenz X eine proteolytische oder chemische Spaltstelle, besonders bevorzugt an ihrem Ende. Ist z.B. die letzte Aminosäure der Sequenz X ein Arg-Rest, so kann die Fusionssequenz X durch tryptische Verdauung (Spaltung nach Arg) abgespalten werden und das aktive Hirudin-Derivat aufgereinigt werden. Die Abspaltung des Fusionsanteils kann jedoch ebenso durch andere bekannte proteolytische Enzyme oder chemische Spaltungsreagenzien erfolgen. Endet z.B. die Aminosäuresequenz von X mit einem Met-Rest, so kann durch eine Halogenacyanospaltung (E. Gross und B. Wittkop, J. Am. Chem. Soc. 82 (1961) 1510-1517) das Fusionsprotein gespalten werden. Beinhaltet z.B. die C-terminale Aminosäuresequenz von X die Aminosäurefolge Ile-Glu-Gly-Arg, so kann die Spaltung mit Faktor Xa erfolgen (EP-A 0 025 190 und EP-A 0 161 973).

Wenn bei dem erfindungsgemäßen Verfahren m = 0, steht Z bevorzugt für Ala, Gln, His, Phe, Tyr, Gly, Ser, Asp oder Asn, besonders bevorzugt für Ala, Gly, Ser, Asp oder Asn. Am meisten bevorzugt ist ein Hirudin-Derivat, bei dem m 0 bedeutet und Z für Ala steht.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit auch Hirudinderivate mit der N-terminalen Sequenz A-Thr-Tyr-Thr-Asp, worin A für Ala, Gln, His, Phe, Tyr, Gly, Ser, Asp oder Asn, vorzugsweise Ala, Gly, Ser, Asp oder Asn steht. Am meisten bevorzugt ist ein Derivat mit der N-terminalen Sequenz Ala-Thr-Tyr-Thr-Asp. Von diesem Hirudin-Derivat konnten im Kulturüberstand einer E. coli-Sekretormutante überraschenderweise bis über 2 g/l Medium aktives Hirudin gewonnen werden.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß durch die Sekretion des Hirudin-Derivats in das Zellmedium die Disulfid-

brücken von Hirudin unter den oxidativen Bedingungen des Mediums richtig ausgebildet werden.

Unter dem Begriff E. coli-Sekretormutanten gemäß vorliegender Erfindung versteht man E. coli-Stämme, welche eine massive Protein-Sekretion in das Kulturmedium zeigen. Ein Verfahren zur Herstellung dieser Sekretormutanten ist in der EP-A-0 338 410 offenbart. Bei der Gewinnung von geeigneten E. coli-Sekretormutanten kann man insbesondere von E. coli DS410 (DSM 4513) oder E. coli BW7261 (DSM 5231) ausgehen. Der jeweilige E. coli-Stamm wird zunächst mit einem Plasmid transformiert, das eine, für ein sekretierbares Protein kodierende DNA-Sequenz enthält. Anschließend wird der transformierte E. coli-Stamm einer Mutagenese, z.B. durch Behandlung mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin unterworfen. Dann erfolgt eine Selektion auf geeignete Sekretormutanten-Stämme. Verwendet man als sekretierbares Protein z.B. α -Cyclodextringlykosyltransferase, so kann man Sekretormutanten durch eine Resistenz gegen die Zellwand-aktive Substanz D-Cycloserin erkennen. Weiterhin bewirkt die Sekretion der α -Cyclodextringlykosyltransferase (CGTase) eine Hydrolyse der Stärke im umgebenden Medium, was bei Verwendung eines Amylopektin-Azur-Mediums eine zusätzliche Selektionsmöglichkeit für Sekretormutanten ergibt.

Als rekombinanter Vektor für die vorliegende Erfindung sind Vektoren geeignet, die entweder in das E. coli-Genom integrieren können (z.B. Bakteriophage λ) oder in der transformierten E. coli-Zelle extrachromosomal vorliegen (z.B. Plasmide). Vorzugsweise verwendet man Plasmide.

Das Genkonstrukt auf dem rekombinanten Vektor, welches für ein Protein, bestehend aus Signalpeptid und dem Hirudin-Derivat kodiert, befindet sich vorzugsweise unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors, besonders bevorzugt eines trp-lac-Fusionspromotors, der durch Lactose-oder IPTG-Zugabe (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) induzierbar ist. Auf dem Vektor soll sich weiterhin ein Selektionsmarker-Gen und gegebenenfalls ein lac-Repressor-Gen befinden.

Als bakterielle Signalsequenz, die eine Sekretion des Hirudin-Derivats ermöglicht, sind prinzipiell alle bekannten Signalpeptide geeignet, die eine Permeation der Membran von E. coli-Zellen erlauben. Vorzugsweise verwendet man daher auch Signalpeptide aus gram-negativen Bakterien (z.B. Signalpeptide folgender Proteine von E. coli: äußeres Membranprotein OmpA (Di Rienzo et al., 1978 Ann. Rev. Biochem. 47: 481-532) alkalische Phosphatase PhoA (Inouye et al., 1982 J. Bacteriol. 149: 434-439) LamB-Protein (Hedgpeth et al., 1980 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77: 2621-2625) Maltose Bindeprotein MalE (Bedouelle H. et al.,

1980 Nature 285: 78 - 81)). Besonders bevorzugt verwendet man das α -CGTase-Signalpeptid.

Ein für das erfindungsgemäße Verfahren geeigneter Vektor ist z.B. das Plasmid pCM705 (Fig. 1), das aus dem in der EP-A-0 383 410 offenbarten Plasmid pCM703 durch Entfernung eines ca. 1 kb langen NruI-Fragments erhältlich ist. Dieser Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenzgen, das Gen für den lac-Repressor und das CGTase-Gen mit einem für das Signalpeptid kodierenden Abschnitt am 5'-Ende. Ein für ein Hirudin-Derivat kodierendes Gen wird in den Vektor pCM705 so integriert, daß intrazellulär ein Vorläufermolekül mit dem Signalpeptid der α -CGTase an seinem N-terminalen Ende entsteht. Das Gen-Konstrukt steht unter Kontrolle des tac-Promotors. Mit dem auf diese Weise erhaltenen Plasmid kann ein E. coli-Sekretor-Mutantenstamm transformiert werden.

Positiv transformierte Klone werden im Schüttelkolben oder im Fermenter kultiviert. Bei Erreichen einer optischen Dichte (OD_{500}) von etwa 1 erfolgt eine Induktion durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) oder Lactose.

Mittels eines Thrombin-Inaktivierungstests (Griesbach et al., Thrombosis Research 37, (1985), 347-350) wird dann der Verlauf der Produktion des Hirudinderivats bestimmt. Die Akkumulation von Fusionsproteinen wird durch HPLC-Chromatographie (reversed phase) analysiert. Der Präanteil von Fusionsproteinen kann dann abgespalten und das entstehende aktive Hirudinderivat aufgereinigt werden.

Folgende Beispiele sollen die Erfindung zusammen mit den Figuren 1 bis 5 näher erläutern.

Es zeigen:

- Fig. 1 das Plasmid pCM705
- Fig. 2 die DNA-Sequenz des synthetischen Hirudin-Gens aus pK152,
- Fig. 3 die Sequenzen der Oligonukleotide HIR1, HIR2 und HIR3,
- Fig. 4 das Plasmid pCM7051 und Fig. 5 das Plasmid pCM7053.

Beispiel 1

Konstruktion des Sekretionsvektors

Das Plasmid pK152 trägt ein synthetisches Hirudingen, dessen Sequenz in der EP-A0171 024 aufgeführt ist. Ausgehend von diesem Plasmid wurde ein etwa 200 bp großes Hinf I - Hind III DNA-Fragment über Agarose-Gelelektrophorese isoliert, das den größten Teil der DNA-Sequenz, die für Hirudin kodiert, beinhaltet (Fig. 2). Die fehlende 5'-terminale Sequenz wird durch ein neusynthetisiertes Oligonukleotid (HIR 1) regeneriert. Die kodierende Sequenz des Oligonukleotids ist in Fig. 3 gezeigt. Durch Fusion der Hinf I-Enden ergibt sich

ein Hirudin-Derivat mit der N-terminalen Sequenz Ala-Thr-Tyr-Thr-Asp.

Das Plasmid pCM705 (Fig. 1) wird mit PstI und Hind III gespalten. Die beiden Schnittstellen liegen im kodierenden Bereich für das Gen der CGTase, wodurch ein etwa 1 kb großes DNA-Stück ausgeschnitten wird. PstI spaltet exakt in dem Bereich, der für die Signalpeptidase-Schnittstelle kodiert.

Die Fragmente pCM705, PstI- Hind III 6,3 kb, pK152 Hinf I - Hind III 0,2 kb und das Oligonukleotid HIR 1 werden miteinander ligiert, wodurch das Plasmid pCM7051 entsteht (Fig. 4). Mit dem Ligationsansatz wird der E. coli-Stamm HB101 (DSM 1607) transformiert. Kolonien, die auf selektivem Medium mit Amylopektin Azur (gefärbtes Amylopektin) keine Stärkeabbauhöfe und somit keine α -CGTase-Expression zeigen, werden isoliert und bis zur Einheitlichkeit gereinigt. Von mehreren gereinigten Klonen wird Plasmid-DNA isoliert und durch eine Restriktionsanalyse charakterisiert. Von zwei Plasmiden, die ein Hirudin-Insert tragen, wird eine Sequenzanalyse der Fusionsregionen durchgeführt.

Plasmid-DNA, die eine korrekte Hirudin-Genkonstruktion trägt, wird mit Nru I und Nde I gespalten und über Agarosegelelektrophorese wird ein 5,18 kb großes Fragment isoliert.

Nach Auffüllen der durch Nde I Spaltung überhängenden Sequenz mit Klenow-Enzym wird das Fragment durch Ligation zirkularisiert. Das entstandene Plasmid wird als pCM7053 bezeichnet (Fig. 5).

Mit diesem Plasmid pCM7053 wird die Sekretormutante E. coli WCM100 transformiert, die auf die in der EP-A-0 338 410 beschriebenen Methode erhalten wurde.

Beispiel 2

Test auf Sekretion von Hirudin in Schüttelkolben-Versuchen

10 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin wurde mit einer frischen Übernachtskultur von WCM100 pCM7053 auf die optische Dichte $OD_{420} = 0,1$ beimpft. Die Kultur wird bei 30°C geschüttelt. Sobald die optische Dichte $OD_{420} = 1,0$ erreicht, wird der Induktor Lactose auf eine Endkonzentration von 1 % zugegeben. Nach 48 Stunden werden von der Kultur Proben entnommen, die Zellen abzentrifugiert und die Hirudin-Konzentration im Überstand bestimmt. Die Bestimmung erfolgt mittels eines Thrombin Inaktivierungstests. Es wurden Ausbeuten bis zu 4000 AT-U/ml (Antithrombin Units) bestimmt (≈ 250 mg/l).

Beispiel 3

Hirudinproduktion im 10 l Fermenter

7 l Minimalmedium mit 100 µg/ml Ampicillin werden mit einer frischen Übernachtskultur von WCM100 pCM7053 auf die optische Dichte $OD_{500} = 0,1$ angeimpft.

Die Fermentationsbedingungen sind

Temperatur:

30 °C

Rührgeschwindigkeit:

450 bis 950 rpm

Belüftung:

0,5 bis 1,5 Vvm

pH-Wert:

7,0 ± 0,1

Bei Erreichen der optischen Dichte $OD_{500} = 1,0$ werden 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid) zugegeben.

40 Stunden nach Zugabe von IPTG konnten 36.000 AT-U/ml im Überstand bestimmt werden (± 2,25 g/l).

Beispiel 4

Sekretion von Hirudin mit der N-terminalen Sequenz Ala-Thr-Arg-Leu-Thr-Tyr-Thr-Asp

verfährt man analog dem Beispiel 1, verwendet jedoch statt dem Oligonukleotid HIR 1 das Oligonukleotid HIR 2 (Fig. 3), so erhält man ein Hirudininfusionsprotein nach Abspaltung des Signalpeptides mit der N-terminalen Sequenz Ala-Thr-Arg-Leu-Thr-Tyr-Thr-Asp. Die Anhäufung dieses Fusionsproteins im Überstand wird durch HPLC-Analyse unter Anwendung von "Reversed Phase" Bedingungen (C_{18} -Chromatographiesäule) bestimmt. Die Fermentation des Stammes WCM100 mit diesem Genkonstrukt erbrachte eine Ausbeute von 25 mg/l Fusionsprotein.

Durch Trypsin-Spaltung kann aktives Hirudin mit der N-terminalen Sequenz Leu-Thr-Tyr-Thr-Asp erzielt werden.

Beispiel 5

Sekretion von Hirudin mit der Sekretormutante WCM88

Die Sekretormutante WCM88, die ebenfalls auf die in der EP-A-0 338 410 beschriebene Weise erhalten wurde, wird mit dem Plasmid pCM7053 transformiert (siehe Beispiel 1). Die Produktion von Hirudin durch Sekretion ins Kulturmedium wird in Schüttelkolben-Versuchen und Fermentationen getestet.

a) Schüttelkolbenversuche

Analog Beispiel 2 wird der Stamm WCM88 pCM7053 kultiviert. Nach 48 Stunden wird im Über-

stand der Kultur die Hirudin-Konzentration bestimmt. Ausbeuten von bis zu 1 800 AT-U/ml wurden erzielt (± 110 mg/l).

b) Produktion im 10 l Fermenter

Die Anzucht des Stammes erfolgt wie in Beispiel 3 beschrieben. 45 Stunden nach Zugabe von IPTG konnten 21 000 AT-U/ml im Überstand festgestellt werden (± 1,3 g/l).

Beispiel 6

Konstruktion eines Sekretionsvektors mit Tetracyclinresistenzgen

Das 1,1 kb NruI-Fragment des Plasmids pBR322 (F. Bolivar et al., Gene 2, 95-113 (1977)) wurde isoliert und mit dem durch NruI-Spaltung linearisierten Plasmid PCM7051 (siehe Fig. 4) ligiert. Mit der Ligationsmischung wurde *E. coli* HB101 transformiert. Transformanten wurden aufgrund ihrer Tetracyclinresistenz selektiert. Die Plasmid-DNA eines selektierten Klon wurde reisoliert und mit NdeI und Aval gespalten. Die DNA-Fragmente wurden in der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Das größere Fragment wurde isoliert und die überhängenden Einzelstrangenden wurden mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt und dann ligiert.

Das resultierende Plasmid war pCMT203.

Beispiel 7

Sekretion von Hirudin unter Verwendung des Sekretionsvektors pCMT203

Die Sekretormutante WCM100 (siehe Beispiel 1) wurde mit dem Plasmid pCMT203 transformiert. Der resultierende Stamm wurde in einem 10 l Fermenter kultiviert. 45 h nach Zugabe von IPTG konnten 42000 AT-U/ml Hirudin bestimmt werden (± 2,63 g/l).

45 Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von Hirudinderivaten aus *E. coli*-Sekretormutanten, dadurch gekennzeichnet, daß man

- (1) einen rekombinanten Vektor konstruiert, auf dem sich das für ein Hirudinderivat kodierende Gen direkt hinter einem DNA-Abschnitt befindet, der für ein bakterielles Signalpeptid kodiert,
- (2) mit dem in Schritt (1) konstruierten rekombinanten Vektor eine *E. coli*-Sekretormutante transformiert,
- (3) die transformierten Zellen in einem Me-

dium kultiviert und

(4) das Hirudinderivat aus dem Medium gewinnt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als rekombinanten Vektor ein Plasmid verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man einen rekombinanten Vektor konstruiert, auf dem sich die für das Hirudinderivat und das Signalpeptid kodierenden DNA-Sequenzen unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors befinden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man induzierbaren Promotor einen trp-lac Fusionspromotor verwendet.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Signalpeptid aus gram-negativen Bakterien verwendet.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man das α -Cyclodextringlycosyltransferase-Signalpeptid verwendet.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als E. coli-Sekretormutante einen Bakterienstamm verwendet, der durch Mutagenese und anschließende Selektion auf Sekretionseigenschaften aus den E. coli-Stämmen DS410 (DSM 4513) oder BW 7261 (DSM 5231) erhalten wurde.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Hirudinderivat gewinnt, das die folgende N-terminale Aminosäuresequenz besitzt:

(X)_m - Z - Thr - Tyr - Thr - Asp

worin m = 0 bis 50,
X für gleiche oder verschiedene genetisch codierbare Aminosäuren steht,
Z für eine genetisch codierbare Aminosäure aus der Gruppe His, Leu, Ile, Ala, Val, Gly, Ser, Asp, Glu, Asn, Gln, Met, Phe und Tyr steht.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz X eine proteolytische oder chemische Spaltstelle enthält.
10. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß m = 0 ist und Z für Ala, Gln,

His, Phe, Tyr, Gly, Ser, Asp oder Asn steht.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß Z für Ala, Gly, Ser, Asp oder Asn steht.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß Z für Ala steht.
13. Hirudinderivat, dadurch gekennzeichnet, daß es die N-terminale Sequenz A-Thr-Tyr-Thr-Asp besitzt, worin A für Ala, Gln, His, Phe, Tyr, Gly, Ser, Asp oder Asn steht.
14. Hirudinderivat nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß A für Ala, Gly, Ser, Asp oder Asn steht.
15. Hirudinderivat nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß A für Ala steht.
16. Rekombinante DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Hirudinderivat nach einem der Ansprüche 13 bis 15 kodiert.
17. Rekombinanter Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine oder mehrere Kopien eines Genkonstruktes enthält, das für ein Protein, bestehend aus einem bakteriellen Signalpeptid und einem Hirudinderivat, kodiert.
18. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Signalpeptid aus gram-negativen Bakterien stammt.
19. Rekombinanter Vektor nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß das Signalpeptid aus dem α -Cyclodextringlycosyltransferase-Gen stammt.
20. Rekombinanter Vektor nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Hirudinderivat folgende N-terminale Aminosäuresequenz besitzt:

(X)_m - Z - Thr - Tyr - Thr - Asp

worin m = 0 bis 50,
X für gleiche oder verschiedene genetisch codierbare Aminosäuren steht,
Z für eine genetisch codierbare Aminosäure aus der Gruppe His, Leu, Ile, Ala, Val, Gly, Ser, Asp, Glu, Asn, Gln, Met, Phe und Tyr steht.
21. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Hirudinderivat die N-terminale Sequenz Ala-Thr-Tyr-Thr-Asp besitzt.

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten:
ES und GR

1. Verfahren zur Gewinnung von Hirudinderivaten aus *E. coli*-Sekretormutanten, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
 - (1) einen rekombinanten Vektor konstruiert, auf dem sich das für ein Hirudinderivat kodierende Gen direkt hinter einem DNA-Abschnitt befindet, der für ein bakterielles Signalpeptid kodiert,
 - (2) mit dem in Schritt (1) konstruierten rekombinanten Vektor eine *E. coli*-Sekretormutante transformiert,
 - (3) die transformierten Zellen in einem Medium kultiviert und
 - (4) das Hirudinderivat aus dem Medium gewinnt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als rekombinanten Vektor ein Plasmid verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man einen rekombinanten Vektor konstruiert, auf dem sich die für das Hirudinderivat und das Signalpeptid kodierenden DNA-Sequenzen unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors befinden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als induzierbaren Promotor einen *trp-lac* Fusionspromotor verwendet.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein Signalpeptid aus gram-negativen Bakterien verwendet.
6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das α -Cyclodextringlycosyltransferase-Signalpeptid verwendet.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als *E. coli*-Sekretormutante einen Bakterienstamm verwendet, der durch Mutagenese und anschließende Selektion auf Sekretionseigenschaften aus den *E. coli*-Stämmen DS410 (DSM 4513) oder BW 7261 (DSM 5231) erhalten wurde.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein Hirudinderivat gewinnt, das die folgende N-terminale Aminosäuresequenz besitzt:

$(X)_m$ - Z - Thr - Tyr - Thr - Asp

worin $m = 0$ bis 50,

X für gleiche oder verschiedene genetisch codierbare Aminosäuren steht,

Z für eine genetisch codierbare Aminosäure aus der Gruppe His, Leu, Ile, Ala, Val, Gly, Ser, Asp, Glu, Asn, Gln, Met, Phe und Tyr steht.

9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Sequenz X eine proteolytische oder chemische Spaltstelle enthält.
 10. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß $m = 0$ ist und Z für Ala, Gln, His, Phe, Tyr, Gly, Ser, Asp oder Asn steht.
 11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß Z für Ala, Gly, Ser, Asp oder Asn steht.
 12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß Z für Ala steht.
 13. Rekombinante DNA, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie für ein Hirudinderivat herstellbar nach einem der Ansprüche 8 bis 12 kodiert.
 14. Rekombinanter Vektor, **dadurch gekennzeichnet**, daß er eine oder mehrere Kopien eines Genkonstruktes enthält, das für ein Protein, bestehend aus einem bakteriellen Signalpeptid und einem Hirudinderivat, kodiert.
 15. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Signalpeptid aus gram-negativen Bakterien stammt.
 16. Rekombinanter Vektor nach einem der Ansprüche 14 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Signalpeptid aus dem α -Cyclodextringlycosyltransferase-Gen stammt.
 17. Rekombinanter Vektor nach einem der Ansprüche 14 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Hirudinderivat folgende N-terminale Aminosäuresequenz besitzt:
- $(X)_m$ - Z - Thr - Tyr - Thr - Asp
- worin $m = 0$ bis 50,
- X für gleiche oder Verschiedene genetisch codierbare Aminosäuren steht,
- Z für eine genetisch codierbare Aminosäure aus der Gruppe His, Leu, Ile, Ala, Val, Gly, Ser, Asp, Glu, Asn, Gln, Met, Phe und Tyr steht.
18. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 17, da-

durch gekennzeichnet, daß das Hirudinderivat die N-terminale Sequenz Ala-Thr-Tyr-Thr-Asp besitzt.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

8

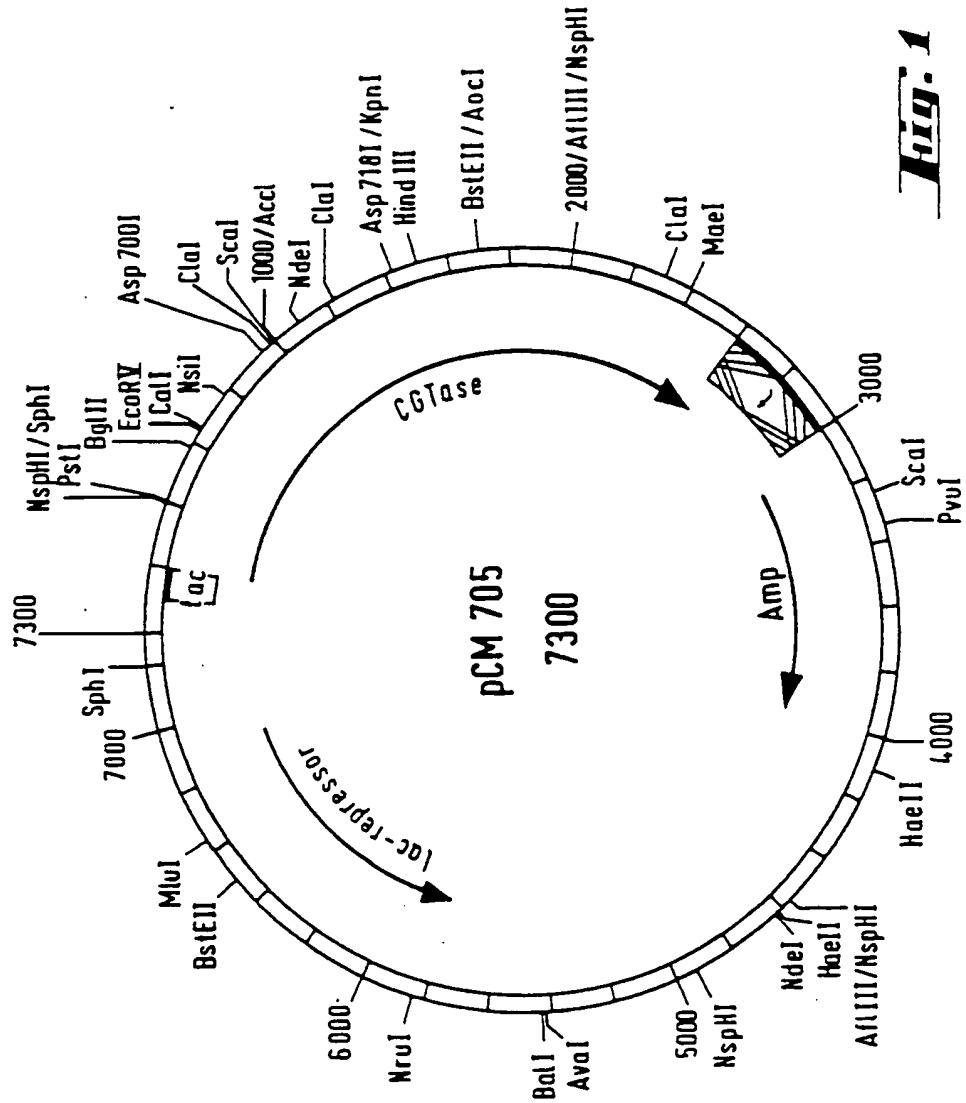
**Fig. 1**

Fig. 2: DNA-Sequenz des synthetischen Hirudingens
aus pK152

Hinf I

20 40 60

acgtatactgactgcactgaatctggtcagaacctgtgcctgtgcgaaggatctaacggtt
tgcataatgactgacgtgacttagaccagtccttgacacggacacgcttcctagattgcaa

ThrTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnVal

Bam HI

80 100 120

tgcgccagggttaacaaatgcataccttgatccgacggtgaaaagaaccagtgcggttact
acgccggtcccattgtttacgtaggaacctaggctgccacttttcttggtcacgcaatga

CysGlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThr

140 160 180

ggcgaagggtaccccgaaaccgcagtcataacgacggcgacttcgaagagatccctgag
ccgcttccatggggctttggcgctcagagtattgctgccgctgaagcttctctagggactc

GlyGluGlyThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGlu

200 220 Hind III

gaataccttcagtaatagagctcgtcgacctgcaggcatgcaagctt
cttatggaagtcattatctcgagcagctggacgtccgtacgttcgaa

GluTyrLeuGlnEndEnd

***Hinf*-3: DNA-Sequenz von Oligonukleotiden**

HIR 1:

Pst IHinf I

acgtatactgactgcaactg
acgttgcaatgactgacgtgactta

Ala Thr Tyr Thr Asp Cys Thr Glu

HIR 2:

Pst IHinf I

acgcgtcttactgtatactgactgcaactg
acgttgccgcagaaatgcataatgactgacgtgactta

Ala Thr Arg Leu Thr Tyr Thr Asp Cys Thr Glu

HIR 3:

Sph IHinf I

cagacgattgctcttactgtatactgcaactg
gtacgtctgctaacgcagagaaatgcataatgactgacgtgactta

Glu Thr Thr Ile Ala Leu Thr Tyr Thr Asp Cys Thr Glu

Signalpeptid α -Glucose

Fig. 4

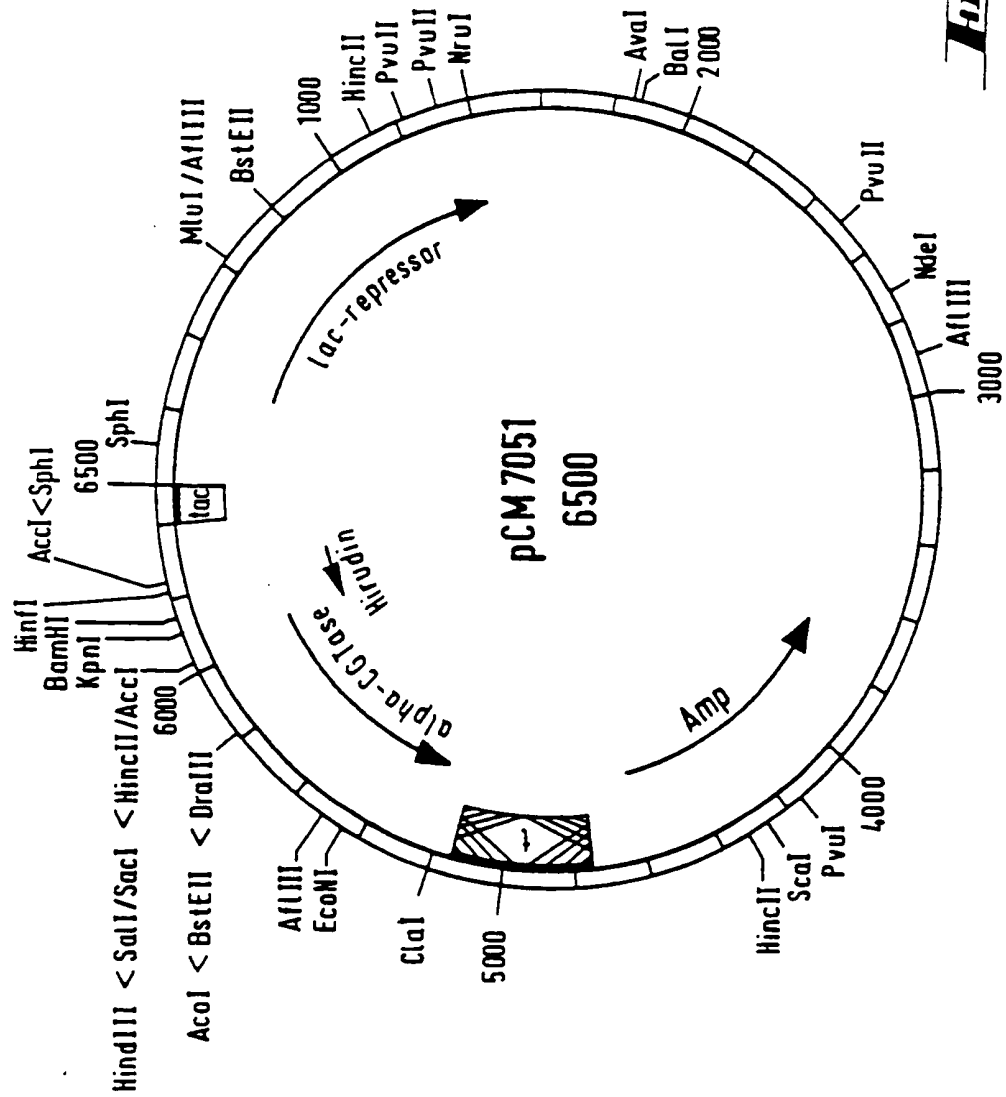
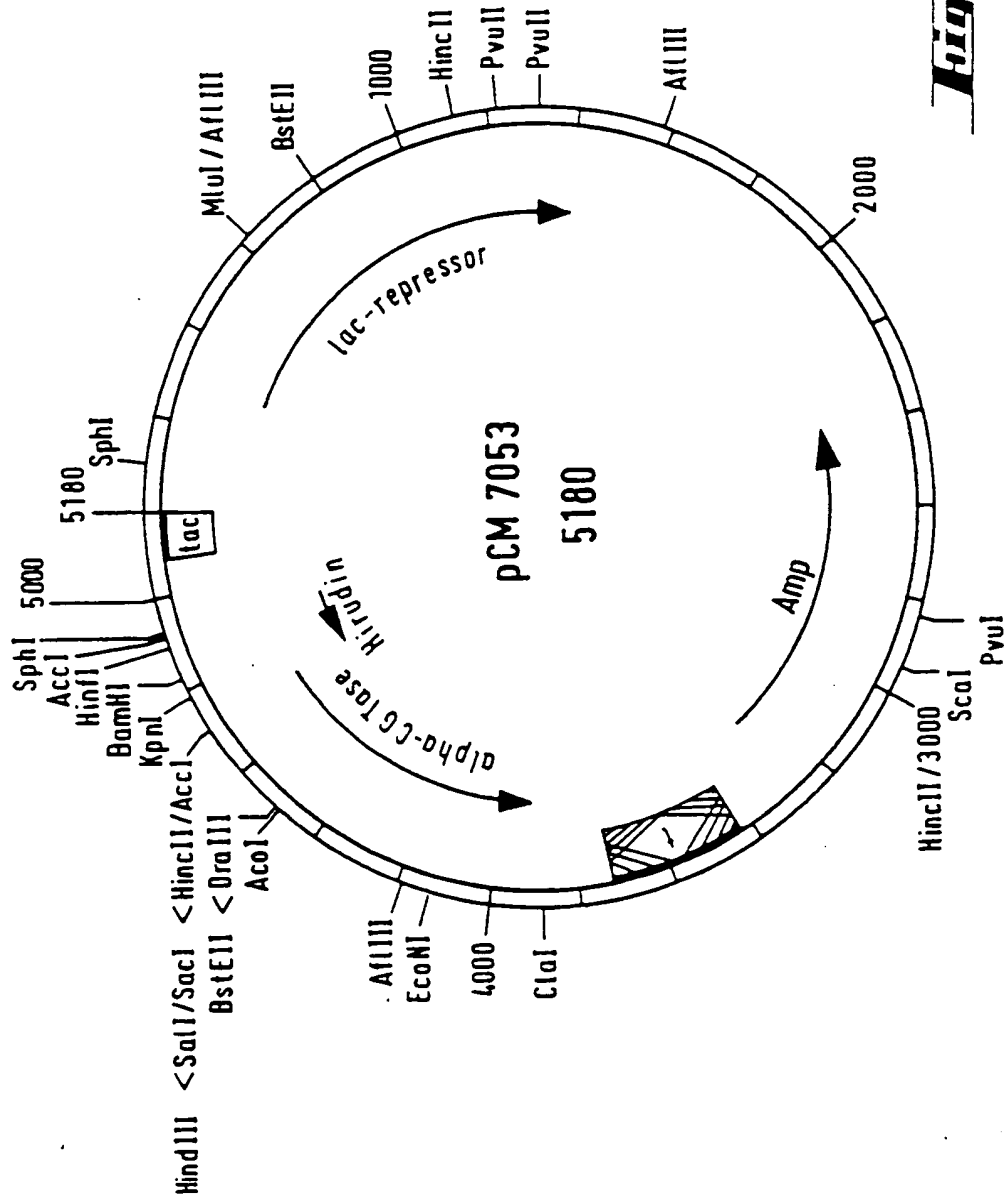


Fig. 5





Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 448 093 A3**

②

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

① Anmeldenummer: 91104422.0

⑤ Int. Cl.⁵: C12N 15/15, C12P 21/02

⑫ Anmeldetag: 21.03.91

③ Priorität: 22.03.90 DE 4009268

④ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
25.09.91 Patentblatt 91/39

⑥ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑧ Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 04.12.91 Patentblatt 91/49

⑦ Anmelder: Consortium für elektrochemische
Industrie GmbH
Zielstattstrasse 20
W-8000 München 70(DE)

⑩ Erfinder: Schmid, Gerhard, Dr.
Dorfstrasse 9a
W-8000 München 60(DE)
Erfinder: Habermann, Paul, Dr.
Rossertstrasse 35
W-6239 Eppstein (Taunus)(DE)

⑤④ Sekretion von Hirudinderivaten.

⑤⑦ Ein Verfahren zur Gewinnung von Hirudinderiva-
ten aus E. coli-Sekretormutanten, bei dem man

(1) einen rekombinanten Vektor konstruiert, auf
dem sich das für ein Hirudinderivat kodierende
Gen direkt hinter einem DNA-Abschnitt befindet,
der für ein bakterielles Signalpeptid kodiert,

(2) mit dem in Schritt (1) konstruierten rekombin-
anten Vektor eine E. coli-Sekretormutante trans-
formiert,

(3) die transformierten Zellen in einem Medium
kultiviert und

(4) das Hirudinderivat aus dem Medium gewinnt,
sowie ein rekombinanter Vektor, der eine oder meh-
rere Kopien eines Genkonstruktes enthält, das für
ein Protein, bestehend aus einem bakteriellen Si-
gnalpeptid und einem Hirudinderivat, kodiert und ein
Hirudinderivat mit der N-terminalen Aminosäurese-
quenz A-Thr-Tyr-Thr-Asp, worin A für Ala, Gln, His,
Phe, Tyr, Glu, Ser, Asp oder Asn steht.

EP 0 448 093 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 91 10 4422

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
Y	EP-A-0 352 228 (CIBA-GEIGY) * Seite 5, Zeilen 14-31, 46-49; Ansprüche *	1-21	C, 12 N 15/15 C 12 P 21/02
X	---	17, 18	
Y	EP-A-0 356 335 (SANOFI S.A.) * Ansprüche *	1-21	
Y	FEBS LETTERS, Band 202, Nr. 2, Juni 1986, Seiten 373-377; J. DOOT et al.: "Expression, secretion and processing of hirudin in E. coli using the alkaline phosphatase signal sequence" * Das ganze Artikel *	1-21	
D, Y	EP-A-0 338 410 (CONSORTIUM FÜR ELEKTROCHEMISCHE IND. GmbH) * Ansprüche; Seite 3, Zeilen 43-53 *	1-21	
P, Y	APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Band 34, Nr. 2, November 1990, Seiten 203-207, Springer-Verlag; E. BENDER et al.: "Synthesis and secretion of hirudin by Streptomyces lividans" * Zusammenfassung; Seite 204, Abbildung 16 *	1-21	
P, X	IDEM	17	
Das vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschließendes Datum der Recherche 13-06-1991	
		Prüfer HUBER A.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X: von besonderer Bedeutung als Priorität Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: nichttechnische Offenbarung P: Zwischenverfahren		I: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älterer Patentschutz, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus einem anderen Quellen angeführtes Dokument A: Mitglied der gleichen Patentfamilie, überlappendes Dokument	

EP 91 10 4422 (P)



Europäisches
Patentamt

GEBÜHRENPFLICHTIGE PATENTANSPRÜCHE

Die vorliegende europäische Patentanmeldung enthält bei ihrer Einreichung mehr als zehn Patentansprüche.

- ☐ Alle Anspruchsgebühren wurden innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Nur ein Teil der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn sowie für jene Patentansprüche erstellt für die Anspruchsgebühren entrichtet wurden.
- nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn Patentansprüche erstellt.

x

MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung; sie enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

Siehe Blatt -B-

- ☐ Alle weiteren Recherchegebühren wurden innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Nur ein Teil der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf Erfindungen beziehen; für die Recherchegebühren entrichtet worden sind.
- nämlich Patentansprüche:
- ☒ Keine der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen.
- nämlich Patentansprüche: 1-7, 10-19, 21 und 8, 9, 20 (teilweise)



Europäisches
Patentamt

EP 91 10 4422 -B-

MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchendeckung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung; sie enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

1. Patentansprüche 1-7, 10-19, 21 und 8, 9, 20 (teilweise): Verfahren zur Herstellung von Hirudinderivaten, Hirudinderivate, dafür kodierende DNA, Vektor.
2. Patentansprüche 8, 9, 20 (partiell): Verfahren zur Herstellung von natürlich vorkommenden Hirudin, Vektor dafür (für den Fall $m=0$, $Z=ile$).